

游离氨基酸对 A $\beta$  多肽异常聚集作用的影响连智慧<sup>a</sup> 王海燕<sup>b</sup> 王中奎<sup>a</sup> 韩大雄<sup>\*,a</sup><sup>(a)</sup> 厦门大学药学院 厦门 361005)<sup>(b)</sup> 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

**摘要** 阿尔兹海默氏病的主要病因之一, 是病人大脑的海马区和皮质区中 A $\beta$  多肽异常聚集形成了老年脑斑. 本工作通过质谱方法研究游离氨基酸存在下铜离子和 A $\beta$  多肽的相互作用, 发现由于其侧链极性和强配位能力, 天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苏氨酸和组氨酸 6 种氨基酸能够在较低浓度下明显抑制铜离子和 A $\beta$  多肽的结合, 由此推测游离氨基酸可能是一种新的与 A $\beta$  多肽异常聚集相关的微环境因素.

**关键词** 老年痴呆症; 氨基酸; A $\beta$  多肽; 金属离子; 质谱

Effect of Free Amino Acids on the Abnormal Accumulation of Amyloid- $\beta$  PeptidesLian, Zhihui<sup>a</sup> Wang, Haiyan<sup>b</sup> Wang, Zhongkui<sup>a</sup> Han, Daxiong<sup>\*,a</sup><sup>(a)</sup> School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)<sup>(b)</sup> Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005)

**Abstract** A major hallmark of Alzheimer's disease is the senile plaques in cerebral cortex and hippocampus, mainly composed of the abnormal accumulation of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides. It was suggested that metal ions (such as copper ions) would be a possible key mediating factor for the formation of amyloid deposits by binding to A $\beta$  peptides and triggering the involved aggregation process. Some previous studies have uncovered that the concentration levels of free amino acids (aa) in the brain of AD patients are different from that of normal controls. So we investigated the interactions between copper ions and A $\beta$  peptides in the presence of free amino acids. The effects of sixteen amino acids on the copper-A $\beta$  complexes were examined by electrospray-ionization mass spectrometry (ESI-MS). Firstly, the mixture solution of A $\beta$ (10-21) peptide (10  $\mu$ mol/L) and Cu(Gly)<sub>2</sub> (40  $\mu$ mol/L) was incubated for 1 h at 37 °C in 10 mmol/L ammonium acetate buffer (pH=6.5). Then stock solution of each amino acid was added yielding A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>/aa mixture solution at the final concentration of 1 : 4 : x (x=0, 1, 2, 3, 4, 5, 10) for 200  $\mu$ L total volume. After 1 h incubation, the samples were analyzed by ESI-MS. Different effects of these amino acids have been observed by comparing the mass spectrum of A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>/aa mixture solution with the spectrum of A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup> mixture solution. Because of their side chain polarity and stronger coordination ability, Asp, Glu, Leu, Tyr, Thr and His can obviously inhibit the combination between copper ions and A $\beta$  peptide at relative low concentrations, and Gln, Asn, Met, Ser and Cys can also inhibit the combination at moderate concentrations. However, Ala, Phe, Ile, Val and Lys can not inhibit at any concentration, and one of them, Lys, can even accelerate their combination. We infer that these amino acids which can inhibit the binding between A $\beta$  peptides and copper ions may have relationships with the formation of the senile plaques and take into consideration that free amino acids may be a new kind of microenvironment factor related with the abnormal accumulation of A $\beta$  peptides.

**Keywords** Alzheimer's disease; amino acids; A $\beta$  peptide; copper ions; ESI-MS

## 1 引言

阿尔兹海默氏病(Alzheimer's disease, AD 病)的主要病因之一是由于病人大脑的海马区和皮质区中  $\beta$ -淀粉样肽(Amyloid- $\beta$  peptide, A $\beta$ )的异常聚集形成老年脑斑, 老年脑斑对脑细胞具有神经毒性, 会导致记忆力下降等老年痴呆症状<sup>[1]</sup>. A $\beta$  多肽的聚集是 AD 病理的始发因素和中心环节, 抑制 A $\beta$  多肽的聚集是 AD 病研究

的关键环节. 生命体系中, A $\beta$ 多肽的聚合过程是极其复杂的, 它会受到其它蛋白的调控以及微环境 pH 值、A $\beta$ 多肽的长度和浓度、离子强度、温度、金属离子等因素的影响, 科学家们对其机理认识还有待深入. 目前微环境因素-金属离子研究最多. AD 病人脑内金属离子的分布平衡被破坏, 老年脑斑中金属离子高度富集, Cu<sup>2+</sup>达 25.0  $\mu$ g/g, Zn<sup>2+</sup>达 69.0  $\mu$ g/g, Fe<sup>2+</sup>达 52.5  $\mu$ g/g, 是非老年脑斑区域金属离子浓度的 1~1.5 倍<sup>[2]</sup>. 过渡金属离子是

\* E-mail: daxiong@xmu.edu.cn

Received May 6, 2012; published July 6, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40976050), the National Public Benefit (Ocean) Research Foundation of China (No. 201105013), and the Grand Research Foundation of Fujian Province (No. 2011YZ0001-1).

项目受国家自然科学基金(No. 40976050)、海洋公益性项目(No. 201105013)和福建省重大专项项目(No. 2011YZ0001-1)资助.

一种高效的 A $\beta$ 多肽交联沉淀剂,即使 A $\beta$ 多肽之间只结合一个铜或锌离子,都可以导致 A $\beta$ 多肽的聚集<sup>[3,4]</sup>. 体外研究表明,降低 pH 值,一般可以促进金属离子诱导 A $\beta$ 多肽的聚集,例如,Atwood 等<sup>[5]</sup>通过凝胶层析法观察 Cu<sup>2+</sup>参与下 A $\beta$ <sub>40</sub>的聚合物的形成,发现 pH 能够可逆地调节 A $\beta$ <sub>40</sub>和 Cu 配合物的沉淀和溶解,即中等酸性(pH = 6.6)条件下,将促进 Cu<sup>2+</sup>媒介的 A $\beta$ <sub>40</sub>多肽的沉淀,碱性条件下, A $\beta$ (Cu)<sub>n</sub>沉淀又可重新溶解. Zn<sup>2+</sup>在中性和酸性条件下,较其它过渡金属离子能更有效地诱导 A $\beta$ 多肽聚集<sup>[6]</sup>.

A $\beta$ 多肽聚集的微环境因素中,游离氨基酸这种在脑内广泛分布的有机小分子并未被涉及. 早期病理研究<sup>[7]</sup>发现 AD 病人出现老年脑斑的海马区和皮质区中,谷氨酸和天冬氨酸这两种重要的中枢神经系统氨基酸类神经递质低于正常人脑的浓度. 例如在海马区,谷氨酸正常为 65.16  $\mu\text{g/g}$ , AD 病人为 48.59  $\mu\text{g/g}$ ,降低了 25%,天冬氨酸的正常浓度为 19.97  $\mu\text{g/g}$ , AD 病人为 12.24  $\mu\text{g/g}$ ,降低了 39%<sup>[8]</sup>,其他氨基酸也存在着浓度失衡. 鉴于此,本文运用电喷雾质谱(ESI-MS)<sup>[9,10]</sup>研究游离氨基酸对 A $\beta$ 多肽聚集的作用. 根据 A $\beta$ 多肽与 Cu<sup>2+</sup>的结合率分析,发现天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苏氨酸和组氨酸对 Cu<sup>2+</sup>和 A $\beta$ 多肽结合的抑制作用最为显著.

## 2 结果和讨论

### 2.1 A $\beta$ 多肽和铜离子的结合比率

通过对 A $\beta$ (10-21)多肽和 Cu(Gly)<sub>2</sub>不同终物质的量浓度比例的 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>混合样的质谱分析,获得 A $\beta$ 与 Cu<sup>2+</sup>的结合率 BA 值(实验部分),见表 1.

表 1 A $\beta$ 多肽和 Cu<sup>2+</sup>结合率的 BA 值

Table 1 The binding affinity (BA) between the A $\beta$  peptide and Cu<sup>2+</sup> at different A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup> molar concentration ratios

A $\beta$ : Cu <sup>2+</sup>	基峰	BA/%
1 : 1	[A $\beta$ +2H] <sup>2+</sup>	12.4
1 : 2	[A $\beta$ +2H] <sup>2+</sup>	48.1
1 : 3	[A $\beta$ +1Cu] <sup>2+</sup>	77.1
1 : 4	[A $\beta$ +1Cu] <sup>2+</sup>	86.6
1 : 5	[A $\beta$ +1Cu] <sup>2+</sup>	88.3
1 : 10	[A $\beta$ +1Cu] <sup>2+</sup>	89.7
1 : 20	[A $\beta$ +1Cu] <sup>2+</sup>	90.1

在表 1 中, A $\beta$ 多肽与 Cu<sup>2+</sup>结合的 BA 值随着二者浓度比例的增大而增大,在物质的量浓度比例为 1 : 1 和 1 : 2 时,质谱图中基峰为 759.4 ([A $\beta$ +2H]<sup>2+</sup>),说明此比例条件下体系中的 A $\beta$ 多肽主要以非结合态形式存在,仅有少量的 A $\beta$ 多肽以 A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>复合物的形式存在;物质的量浓度比例上升为 1 : 3 时,质谱图中的基峰变为 790.3 ([A $\beta$ +1Cu]<sup>2+</sup>),此时体系中 A $\beta$ 多肽主要以

A $\beta$ -Cu<sup>2+</sup>复合物的形式存在;在物质的量浓度比例为 1 : 4 时, BA 值增大为 86.6%, A $\beta$ 多肽和 Cu<sup>2+</sup>结合趋于饱和;当物质的量浓度继续增大时,虽然 BA 值略有升高,但金属离子的过饱和,导致质谱图中的杂峰增多,背景干扰明显增强. 因此本实验选择在 A $\beta$ (10-21)多肽和 Cu(Gly)<sub>2</sub>终物质的量浓度比例为 1 : 4 时研究游离氨基酸对 A $\beta$ 多肽与 Cu<sup>2+</sup>结合的影响.

### 2.2 游离氨基酸对 A $\beta$ 多肽和铜离子结合率的影响

A $\beta$ (10-21)多肽的质谱图 1 中,主要呈现三个特征离子峰: 759.4 ([A $\beta$ +2H]<sup>2+</sup>), 506.9 ([A $\beta$ +3H]<sup>3+</sup>)和 1517.5 ([A $\beta$ +1H]<sup>1+</sup>),基峰为带二价电荷的 759.4,同时伴随有加钠和加钾峰: 770.4 ([A $\beta$ +1Na+1H]<sup>2+</sup>), 778.4 ([A $\beta$ +1K+1H]<sup>2+</sup>), 789.8 ([A $\beta$ +1Na+1K]<sup>2+</sup>). 加入 Cu(Gly)<sub>2</sub>孵育 1 h 后,测得质谱图 2, A $\beta$ 多肽结合一个 Cu<sup>2+</sup>的相关质谱峰: 527.2 ([A $\beta$ +1Cu+1H]<sup>3+</sup>), 790.3 ([A $\beta$ +1Cu]<sup>2+</sup>), 1580.3 ([A $\beta$ +1Cu-1H]<sup>1+</sup>),其中 790.3 为基峰;结合两个 Cu<sup>2+</sup>的质谱峰: 820.3 ([A $\beta$ +2Cu-2H]<sup>2+</sup>), 1641.4 ([A $\beta$ +2Cu-3H]<sup>1+</sup>). 并出现结合态 A $\beta$ 多肽加钠和加钾峰: 800.7 ([A $\beta$ +1Cu+1Na-1H]<sup>2+</sup>), 809.3 ([A $\beta$ +1Cu+1K-1H]<sup>2+</sup>), 831.7 ([A $\beta$ +2Cu+1Na-3H]<sup>2+</sup>), 839.7 ([A $\beta$ +2Cu+1K-3H]<sup>2+</sup>). 从相对丰度可知, A $\beta$ 多肽主要与一个 Cu<sup>2+</sup>结合. 当分别加入十六种氨基酸(甘氨酸没有侧链,而其余三种因水溶性差未能分析)后,部分游离氨基酸导致结合态 A $\beta$ 多肽的丰度呈现明显变化. 图 3 和图 4 分别为 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>/aa 终物质的量浓度比为 1 : 4 : 10 的 Ser 和 Glu 混合液质谱图,与图 2 相比,虽然图 3 基峰仍为 790.3 ([A $\beta$ +1Cu]<sup>2+</sup>),但 759.4 ([A $\beta$ +2H]<sup>2+</sup>)的相对离子强度明显增强,说明在游离 Ser 作用下,溶液中结合态的 A $\beta$ 多肽相对含量降低,非结合态的 A $\beta$ 多肽相对含量增大. 图 4 的基峰由 759.4 ([A $\beta$ +2H]<sup>2+</sup>)替代了 790.3 ([A $\beta$ +1Cu]<sup>2+</sup>),说明游离 Glu 显著抑制了 A $\beta$ 多肽和 Cu<sup>2+</sup>结合.

为了直观显示游离氨基酸对 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>结合率的影响,本文通过对一系列质谱峰强度和稳定性的对照分析,确定了非结合态 A $\beta$ 多肽的两个特征峰为 759.4 ([A $\beta$ +2H]<sup>2+</sup>)和 1517.5 ([A $\beta$ +1H]<sup>1+</sup>);结合态 A $\beta$ 多肽特征峰为 790.3 ([A $\beta$ +1Cu]<sup>2+</sup>), 1580.3 ([A $\beta$ +1Cu-1H]<sup>1+</sup>), 820.3 ([A $\beta$ +2Cu-2H]<sup>2+</sup>)和 1641.4 ([A $\beta$ +2Cu-3H]<sup>1+</sup>). 基于以上特征峰计算了氨基酸加入前后的 BA 值(表 2),其它微弱信号峰被忽略. 除了 Cu(Gly)<sub>2</sub>试剂引入的甘氨酸外,无另加氨基酸时 BA 均值为 86.6%,即 A $\beta$ 多肽大部分以结合态的形式存在. 随着氨基酸加入量的增加,BA 值出现不同程度的变化. A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>/aa 终物质的量浓度比为 1 : 4 : 1 时, Asp 的加入使 BA 值由 86.6%降为 33.0%, Glu 的加入使 BA 值由 86.6%降为 30.0%, Leu 的加入使 BA 值由 86.6%降到 27.4%, Tyr 的加入使 BA 值由 86.6%降为 22.1%, Thr 的加入使 BA 值由 86.6%降为 43.0%,而其它氨基酸对 BA 值影响不明显. 随着氨基酸

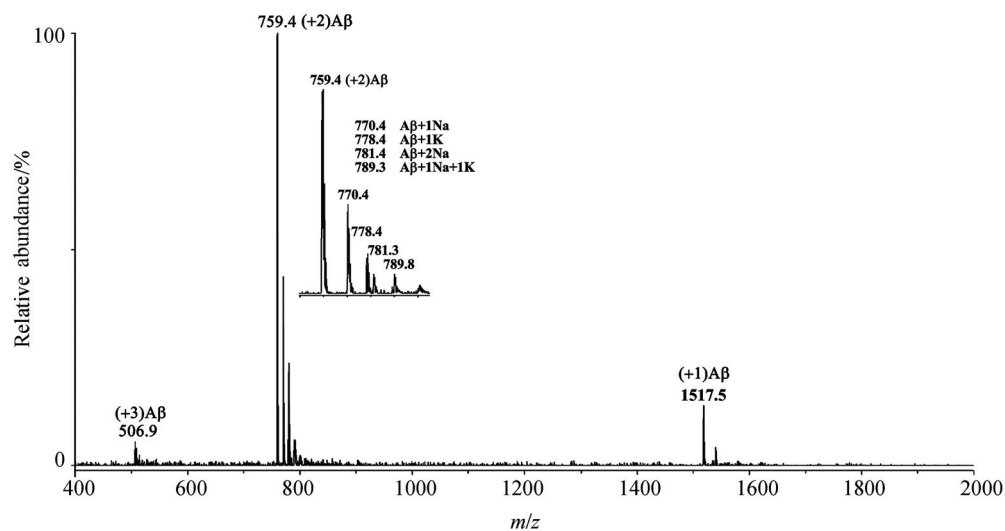
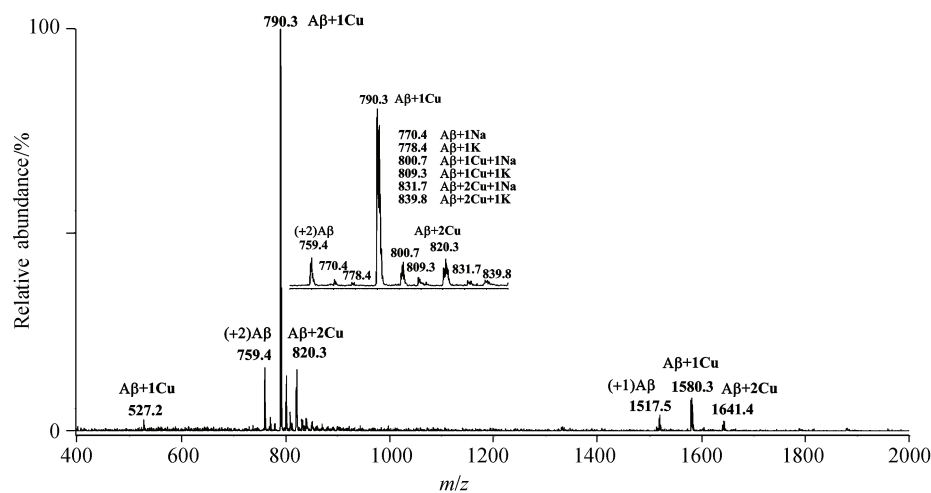
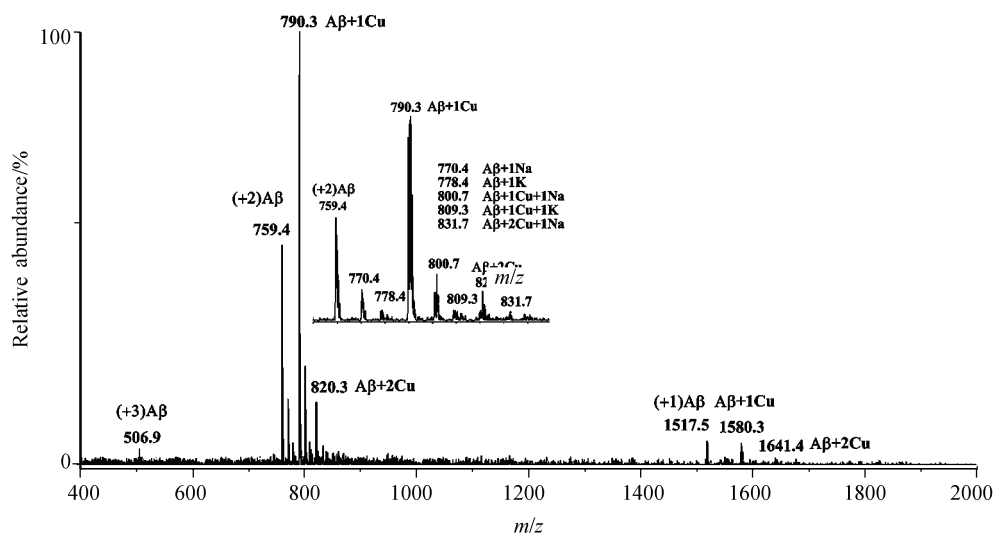


图1 10 μmol/L Aβ(10-21)多肽的质谱图

Figure 1 ESI-MS spectrum of Aβ(10-21) peptide at 10 μmol/L

图2 Aβ:Cu(Gly)<sub>2</sub>混合液的质谱图(Aβ/Cu<sup>2+</sup>终物质的量浓度为1:4)Figure 2 ESI-MS spectrum of Aβ peptide and Cu(Gly)<sub>2</sub> (Aβ:Cu<sup>2+</sup>=1:4, molar concentration ratio)图3 Aβ:Cu<sup>2+</sup>:Ser终物质的量浓度为1:4:10的混合液质谱图Figure 3 ESI-MS spectrum of Aβ:Cu<sup>2+</sup>:Ser mixture solution (Aβ:Cu<sup>2+</sup>:Ser=1:4:10, molar concentration ratio)

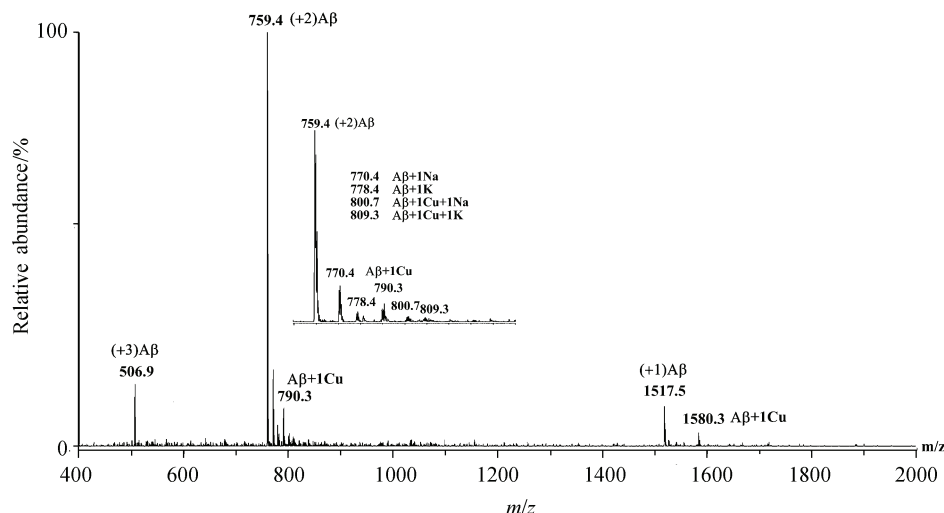


图4  $A\beta$ :  $Cu^{2+}$ : Glu 终物质的量浓度比为 1:4:10 的混合液质谱图

Figure 4 ESI-MS spectrum of  $A\beta$ :  $Cu^{2+}$ : Glu mixture solution ( $A\beta$ :  $Cu^{2+}$ : Glu=1:4:10, molar concentration ratio)

加入量的进一步增加,  $A\beta/Cu^{2+}/aa$  终物质的量浓度比为 1:4:5 时, BA 值继续降低, 如 Asp 的加入使 BA 值由 33.0%降为 8.7%, His 的加入使 BA 值由 83.2%降为 40.4%. BA 值显著降低说明在较低浓度 Asp, Glu, Leu, Tyr, Thr 和 His 存在下,  $A\beta$  多肽与  $Cu^{2+}$  的结合被有效抑制。

$A\beta/Cu^{2+}/aa$  终物质的量浓度比为 1:4:5 时, Asn, Cys, Gln, Met 和 Ser 的加入对 BA 值影响很小, 仍为 80.0%以上, 但当终物质的量浓度比为 1:4:10 时, BA 值降到 80.0%以下, 其中 Cys 的影响较明显, BA 值已经降到 50.9%, 这说明 Asn, Cys, Gln, Met 和 Ser 在低浓度下基本不影响  $A\beta$  多肽和  $Cu^{2+}$  的结合率, 仅在较高浓度下产生影响。随着 Ala, Phe, Ile 和 Val 加入量的增加, BA 值变化甚微, 仍为 80.0%以上, 对  $A\beta$  多肽和  $Cu^{2+}$  结合基本没有抑制。另外值得注意的是, Lys 对 BA 值的影响与其它氨基酸不同, 即 BA 值随着氨基酸浓度的增加而增大, 当  $A\beta/Cu^{2+}/Lys$  终物质的量浓度比为 1:4:10 时, BA 值从 86.6%上升为 91.4%, 说明 Lys 不是抑制而是促进了  $A\beta$  多肽和  $Cu^{2+}$  结合。

### 2.3 游离氨基酸结构性质与抑制率的关系

表 2 中 Asp 和 Glu 属于极性带负电荷的氨基酸(C-), 在生理溶液中其侧链带负电, 易于与带正电荷的金属离子产生静电、配位作用, 抑制率最强; Tyr 和 Thr 属于极性不带电荷的氨基酸(P), 其侧链残基上均含羟基(—OH), 易于与金属离子形成配位键, 抑制率也很强; His 是弱碱性氨基酸(P, C+), 虽然其咪唑环侧链上的氮原子含有孤对电子, 极易和金属离子形成配位键, 但是其正电性抵消了部分与金属的作用力, 所以抑制率较强; Asn, Gln, Ser 属于极性不带电荷的氨基酸(P), 其侧链残基上含有氮原子或氧原子, Cys 和 Met 亦属于极性不带电荷的氨基酸(P), 其侧链中存在硫原子, 这些原子都能为金属离子和氨基酸形成配合物提供配位点, 所

以表现出一定的抑制率; Ala, Ile, Phe, Val 属于非极性的氨基酸(H), 它们的侧链残基中不存在氮、氧、硫等易于配位的原子, 对  $Cu^{2+}$  和  $A\beta$  多肽的结合没有抑制作用; Lys 属于极性带正电氨基酸(C+), 与  $Cu^{2+}$  所带的正电荷相互排斥, 不能形成配合物, 这可能是 Lys 导致 BA 值变化与其它氨基酸不一致的原因。

## 3 结论

本文所涉及的 16 种氨基酸由于侧链极性和与金属离子配位能力的差异, 导致其对  $A\beta$  多肽和  $Cu^{2+}$  结合具有不同的抑制作用: Asp, Glu, Leu, Tyr, Thr 和 His 6 种氨基酸在较低浓度下能够抑制  $Cu^{2+}$  和  $A\beta$  多肽的结合; 而 Asn, Cys, Gln, Ser 和 Met 在较高浓度下才能够抑制  $Cu^{2+}$  和  $A\beta$  多肽的结合; 其余 5 种氨基酸 Ala, Ile, Phe, Lys 和 Val 没有抑制作用; Lys 的影响作用与上述氨基酸不同, Lys 的加入有助于  $A\beta$  多肽和  $Cu^{2+}$  的结合。因此, 游离氨基酸有可能是一种新的影响  $A\beta$  多肽的聚集的微环境因素, 它在大脑中分布失衡, 有可能促进  $A\beta$  多肽的异常聚集, 进而形成老年脑斑。

## 4 实验

### 4.1 试剂与仪器

$A\beta(10-21)$ 多肽(纯度>98%) (Y10EVHHQ15KL-FF20A; 分子量为 1516.5 Da)购自杭州中肽化学品有限公司。L 型氨基酸(aa)、 $Cu(Gly)_2$  以及醋酸铵为分析纯, 其余溶剂均为色谱纯。

安捷伦 6310 离子阱质谱仪的测试条件: 电喷雾离子源(ESI source), 正离子电离模式, 喷雾电压 3500 V, 加热毛细管温度 250 °C, 氮气为干燥气, 流速为 4.5 L/min, 流动注射泵进样, 进样量为 3  $\mu$ L/min。



表2 在氨基酸存在下 A $\beta$  多肽和 Cu<sup>2+</sup> 结合率的 BA 值<sup>a</sup>Table 2 The binding affinity (BA) between the A $\beta$  peptide and Cu<sup>2+</sup> in the presence of free amino acids

aa	A $\beta$ /Cu <sup>2+</sup> /aa								
	侧链性质	抑制率	1 : 4 : 0	1 : 4 : 1	1 : 4 : 2	1 : 4 : 3	1 : 4 : 4	1 : 4 : 5	1 : 4 : 10
Asp(天冬氨酸)	C—	++	86.6	33.0	18.8	16.3	15.8	8.7	7.7
Glu(谷氨酸)	C—	++	86.6	30.0	19.2	12.1	11.0	12.2	8.2
Leu(亮氨酸)	H	++	86.6	27.4	16.9	14.4	11.2	8.9	8.1
Tyr(酪氨酸)	P	++	86.6	22.1	18.1	17.0	13.2	10.5	8.3
Thr(苏氨酸)	P	++	86.6	43.0	36.0	31.7	26.3	24.4	23.4
His(组氨酸)	P, C+	++	86.6	83.2	81.4	74.7	71.3	40.4	10.6
Asn(天冬酰胺)	P	+	86.6	82.9	82.1	84.0	81.8	80.8	67.0
Cys(半胱氨酸)	P	+	86.6	84.8	84.4	84.2	83.3	83.4	50.9
Gln(谷氨酰胺)	P	+	86.6	86.3	86.4	85.4	81.4	80.6	75.2
Ser(丝氨酸)	P	+	86.6	84.5	85.5	82.4	82.1	82.8	69.3
Met(甲硫氨酸)	H	+	86.6	85.6	85.4	85.6	82.7	83.0	78.2
Ala(丙氨酸)	H	—	86.6	86.8	84.1	84.9	84.1	83.1	82.6
Ile(异亮氨酸)	H	—	86.6	86.6	85.6	85.8	85.3	84.5	83.0
Phe(苯丙氨酸)	H	—	86.6	84.9	86.1	84.7	84.2	83.3	81.9
Val(缬氨酸)	H	—	86.6	85.2	85.8	85.6	85.2	83.9	83.0
Lys(赖氨酸)	C+	—	86.6	85.0	86.6	88.1	86.9	88.1	91.4

<sup>a</sup> Data in the table are the average of three parallel experiments; BA values less than 80% are in the gray area; BA values more than 80% are in the other area; Side chain properties: charge (C), polarity (P), hydrophobicity (H); Inhibition ratio: high (++), low (+), not (—).

## 4.2 实验过程

用 pH=6.5 醋酸铵缓冲溶液配成 A $\beta$ (10-21)多肽和 Cu(Gly)<sub>2</sub> 不同终物质的量浓度比例的 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>混合样, 震荡混匀后, 置于 37 °C 水浴孵育 1 h 后进行质谱分析.

用 pH=6.5 醋酸铵缓冲溶液配成 A $\beta$ (10-21)多肽和 Cu(Gly)<sub>2</sub> 的终物质的量浓度比为 1 : 4 (10  $\mu$ mol/L: 40  $\mu$ mol/L)的 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>混合样, 震荡混匀后, 置于 37 °C 水浴孵育 1 h. 在 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>混合样中分别加入不同浓度的游离氨基酸, 使 A $\beta$ /Cu<sup>2+</sup>/aa 的终物质的量浓度比为 1 : 4 : x (x=0, 1, 2, 3, 4, 5, 10); 充分震荡, 置于 37 °C 水浴孵育 1 h 后, 进行质谱分析. 不同浓度的各种氨基酸对 A $\beta$  多肽和 Cu<sup>2+</sup>结合作用的影响, 通过 A $\beta$  多肽和 Cu<sup>2+</sup>的结合率来表示, 即 BA 值(Binding affinity), 其定义如下:

$$BA = \frac{\sum (\text{结合态A}\beta\text{的丰度})}{\sum (\text{结合态A}\beta\text{的丰度} + \text{非结合态A}\beta\text{的丰度})} \times 100\%$$

BA 值越大, 结合态 A $\beta$  多肽的丰度越高, 说明 A $\beta$  多肽和 Cu<sup>2+</sup>结合率就越大.

## References

- [1] Khachaturian, Z. S. *Arch. Neurol.* **1985**, 42, 1097.
- [2] Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. *J. Neurol. Sci.* **1998**, 158, 47.
- [3] Han, D. X.; Yang, P. *Sci. China. Ser. B: Chem.* **2004**, 48, 126.
- [4] Han, D. X.; Wang, H. Y.; Yang, P. *Biometals* **2008**, 21, 189.
- [5] Atwood, C. S.; Scarpa, R. C.; Huang, X.; Mior, R. D.; Jones, W. D.; Fairlie, D. P.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *J. Neurochem.* **2000**, 75, 1219.
- [6] Liu, S. T.; Howlett, G.; Barrow, C. J. *Biochemistry* **1999**, 38, 9373.
- [7] Ellison, D. W.; Beal, M. F.; Mazurek, M. F.; Bird, E. D.; Martin, J. B. *Neurology* **1986**, 20, 616.
- [8] Sasaki, H.; Muraomoto, O.; Kanazawa, I.; Arai, H.; Kosaka, K.; Iizuka, R. *Ann. Neurol.* **1986**, 19, 263.
- [9] Drochioiu, G.; Manea, M.; Dragusanu, M.; Murariu, M.; Dragan, E. S.; Petre, B. A.; Mezo, G.; Przybylski, M. *Biophys. Chem.* **2009**, 144, 9.
- [10] Zirah, S.; Rebuffat, S.; Kozin, S. A.; Debey, P.; Fournier, F.; Lesage, D.; Tabet, J. C. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 228, 999.

(Lu, Y.)